

ドナーリンパ球輸注によって誘導される抗白血病免疫担当T細胞の動態

金沢大学大学院医学系研究科内科学専攻細胞移植学

(旧講座名：第三内科学)

(主任：中尾眞二教授)

小 谷 岳 春

慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia, CML) は同種造血幹細胞移植後に再発を来したとしても、それが慢性期の再発であればドナーリンパ球輸注 (donor lymphocyte infusion, DLI) によって、多くの場合治癒させることができる。DLIが有効であった例ではDLI後2-3ヶ月目に特定のクローンタイプを持つCD4陽性細胞の増殖が末梢血中に検出され、これに続いてフィラデルフィア染色体 (Philadelphia, Ph) 陽性細胞の割合が減少する。このような移植片対白血病 (graft-versus-leukemia, GVL) 効果担当T細胞の動態を明らかにするため、DLIが有効であった5例の末梢血についてT細胞受容体 (T cell receptor, TCR) β 鎖V領域相補性決定領域 (complementarity-determining region, CDR) 3サイズの分布を経時的に解析した。そのうち1例については同定したGVL効果担当T細胞のCDR3 cDNAをリアルタイムPCRで定量することにより、GVL効果担当T細胞の経時的な推移を検討した。CDR3サイズ分布の偏りがみられるBVファミリーは5例でそれぞれ異なっていた。BV16⁺T細胞の増殖を認めた1例のCDR3配列はQDRであった。このCDR3配列に特異的なプライマーとリアルタイムPCRを用いて、骨髓と末梢血におけるQDRクローンを経時的に定量したところ、末梢血QDR/グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 値はDLI後10週間後にピークとなり、その後速やかに減少した。一方、骨髓QDR/GAPDH値は5週間後より上昇し、10週間後にピークとなったのち、20週目でも高値を持続していた。このQDR3配列はDLI前の患者骨髓中には検出されたが、DLIに用いたドナーリンパ球には検出されなかった。以上の結果から、末梢血中のクローン性T細胞集団は、骨髓中の同じ抗原特異的T細胞が最大に増殖した際に一過性に流出したものであり、標的であるPh陽性幹細胞の減少に伴ってT細胞の増殖が鎮静化した結果、末梢血から消失したと考えられた。また、GVL効果担当T細胞はDLIによって持ち込まれたものではなく、DLI前から患者の末梢血中に存在していたことが示唆された。

Key words BV repertoire, CML, DLI, GVL effect, real-time PCR

慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia, CML) は、造血幹細胞移植後に再発したとしても慢性期であればほとんどがドナーリンパ球輸注 (donor lymphocyte infusion, DLI) によって治癒する事が知られている^{1)~4)}。このようなDLIによる移植片対白血病 (graft-versus-leukemia, GVL) 効果は同種抗原を認識するCD4陽性T細胞が担っていると考えられており⁵⁾、*in vivo*の観察ではマイナー組織適合抗原であるHA-1やHA-2などに特異的なCD8陽性T細胞がGVL効果に関与していることが示されている⁶⁾。しかし、GVL効果の標的となるこれら以外の抗原については全く分かっていない。

T細胞は種々の抗原に対応するレセプターを発現しており、そのレセプター構造の中でも抗原に対する特異性は主に相補性決定領域 (complementarity-determining region, CDR) 3の多様性によって決定される。その多様性はgerm lineのV, D, J, C領域遺伝子の再構成と再構成の過程でV-D-J間に生ずる塩基の

付加や欠失によって生みだされ、CDR3配列が共通のT細胞は一つのクローンに由来する。ある抗原刺激によって増殖したT細胞は、特定のCDR3配列を指標とすることによって、その動態を明らかにすることができる。

DLIを受けたCMLの慢性期再発患者では、特定のクローンタイプを持つCD4陽性T細胞がフィラデルフィア染色体 (Philadelphia, Ph) 陽性細胞の減少に一致して末梢血で一過性に増殖する⁷⁾。このようなGVL効果に関連したT細胞の動態を検討すれば、GVL効果のメカニズムを明らかにできる可能性がある。そこで、T細胞受容体 (T cell receptor, TCR) β 鎖V領域 (beta chain variable region, BV) CDR3サイズ分布解析を用いて、DLI後の末梢血・骨髓における抗原特異的T細胞の増殖を検出することにより、GVL効果担当T細胞のクローンタイプを同定し、このT細胞の経時的な推移を検討した。

平成20年11月21日受付、平成20年12月25日受理

Abbreviations: BM, bone marrow; BV, beta chain variable region gene; CDR, complementarity determining region; CML, chronic myelogenous leukemia; DLI, donor lymphocyte infusion; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GVHD, graft versus host disease; GVL, graft versus leukemia; HLA, Human leukocyte antigen; mHA, minor histocompatibility antigen; PB, peripheral blood; Ph, Philadelphia chromosome; RIST, reduced-intensity stem cell transplantation; SCT, stem cell transplantation; TAA, tumor-associated antigen; TCR, T cell receptor; TSA, tumor-specific antigen.

対象および方法

I. 対象

DLIが有効であった移植後CML慢性期再発の5例を対象とした。再発の内訳は血液学的再発が3例、細胞遺伝学的再発が2例であり、移植ドナーは4例がHLA一致同胞ドナー、1例はHLA適合非血縁ドナーであった(表1)。

II. 方法

1. 細胞の採取

これらの患者から同意を取得後、DLI前後に経時的に5～10mlの患者末梢血および骨髓血をヘパリン入りの採血管で採取した。採取した血液からLymphoprep (Mycomed Pharma A.S., Oslo, Norway)により単核球を分離し、一部の検体については、ビーズ (Dynal A.S., Oslo, Norway)を用いてCD4⁺、CD8⁺T細胞を単離した。また、症例1についてはDLI後に慢性移植片対宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD)を発症し、その際に頬粘膜をスワブにて採取した。

2. GVL効果の判定

GVL効果の有無は、bcr/abl遺伝子陽性細胞の割合 (Philadelphia染色体陽性細胞率)を骨髓のG-バンディングおよび骨髓・末梢血のFISH (fluorescence in situ hybridization)法で評価することにより判定した。

3. RNAの抽出およびcDNAの合成

分離した単核球からIsogen (ニッポンジーン, 東京)を用いてRNAを抽出⁸⁾後、1μgのRNAからoligo (dT) 12-18, SuperScriptII reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA)を用いてcDNAを合成した。

4. CDR3 サイズ分布解析

T細胞レセプターのBVファミリーに特異的な24個のforward primer (BVs 1-20⁹⁾, BVs 21-24¹⁰⁾)と定常領域 (BC)のreverse primer¹¹⁾を用いて各細胞由来のCDR3領域を含むcDNA断片を増幅した。VB10, VB20は偽遺伝子のため、この研究では除外した¹²⁾。cDNAは35サイクル (95℃ 1分, 55℃ 1分, 72℃ 1分)で増幅し、1μlの増幅産物を100%ホルムアミド2μlと混合し、90℃で3分過熱後、6.75%のポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した。各BVファミリーのCDR3サイズをシーケンサー (Applied Biosystems Division, Foster City, USA)と蛍光発光の強度をピークとして表すプログラムを用いて解析した¹³⁾。

5. 増幅産物のクローニングおよびシーケンシング

増幅産物をアガロースゲルで電気泳動し、泳動断片中のDNAをDEPE紙で抽出後、pGEM-Tベクターシステム

(Promega Corp., Madison, USA)を用いてcDNA断片をクローニングした。インサートが含まれている3個～20個のコロニーを無作為に選び、ABI PRISM cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer, 東京)とDNAシーケンサー (ABI 373; Perkin-Elmer, 東京)を用いてCDR3領域の塩基配列を決定した。

6. QDR⁺T細胞の定量

BV16⁺GVL効果担当T細胞のCDR3モチーフ (QDR)を含む特異的primerを作成し、cDNAをテンプレートとしてリアルタイムPCRを行なった。リアルタイムPCRはLightCycler (ロシュ・ダイアグノスティックス, 東京)を用い、その分析には、LightCycler software (Roche Molecular Biochemicals, LightCycler Software, Roche Diagnostic, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)とLightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany)を用いた。外部標準にはQDRシーケンスのプラスミドを用い、各サンプル間の誤差を調整するため、内部標準としてヒトグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) (Search LC, Heidelberg, Germany)を使用した。定量化をするにあたって、標準とするプラスミドの濃度を変えて対数直線領域の交点を測定し、標準曲線を作成した。さらに、融解曲線解析により特異性を確認した。QDR遺伝子の発現量はQDR mRNAとGAPDH mRNAの比 (QDR/GAPDH)をとることにより評価した。

7. サザンブロット法によるQDR配列の検出

QDR配列に相当するオリゴヌクレオチドプローブを合成し、ジゴキシゲニン-dUTP (ライフテクノロジー, 東京)で標識した。BV16特異的なプライマーとBCプライマーを用いて増幅したcDNAを電気泳動し、ゲルを固定後、帯電させたナイロン膜 (Millipore, Danvers, MA)にDNAを写し取った。DNAを紫外線照射で固定後、非特異的な反応を抑えるため、ナイロン膜を5×SCC, 1% blocking solution, 0.1% N-lauroylsarkosine, 0.02% SDS中で0.1μmol/ml poly(A)とともに37℃でナイロン膜を保温した。0.5μmol/ml ジゴキシゲニン (digoxigenin)でラベルしたQDRのプローブを5×SCC, 1% blocking solution, 0.1% N-lauroylsarkosine, 0.02% SDSを緩衝液として55℃24時間で保温した。ナイロン膜をDigoxigenin Nucleic Acid Detection Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)で処理し、アルカリフォスファターゼ染色することにより、QDR配列を持つcDNA断片を検出した。

成 績

I. GVL効果の発現

抗原刺激を受けないT細胞集団のCDR3のサイズ分布は、最も平均的なcDNA長を頂点とする正規分布を示すが、特定の抗原刺激によって一部のT細胞が増えると、分布の偏倚や単一ピークを示す。図1～5に症例1～5の末梢血のCDR3のサイズ分布解析を示す。症例1ではDLI後11週目にBV11に新たなピークが出現した。これに伴い、末梢血のPh陽性細胞が減少した(図1)。骨髓ではDLI後、5週目にBV11に既にピークが出現していた(図8)。症例2ではDLI後19週目にBV21に新たなピークが出現した。骨髓でも同様に19週目にBV21にピークが出現した(データ示さず)。これに伴い、末梢血のPh陽性細胞が減少した。BV22にDLI後24週目に新たなピークが出現しているが、オリゴクローナルな増加であるため、本例ではBV21⁺T細胞

Table 1. Patient characteristics

Patient	Age	Gender	Relapse state	Donor	Time after DLI (Week)
1	35	F	Hematological	HLA id sid	99
2	40	F	Hematological	HLA id sid	24
3	26	F	Cytogenetic	HLA id mother	43
4	46	M	Cytogenetic	HLA id sid	8
5	39	F	Hematological	HLA id sid	18

F, female; M, male; HLA, Human leukocyte antigen; id, identical; Sib, sibling.

胞がGVL効果に関連したT細胞と考えられた(図2)。症例3ではDLI後43週目にBV13.2が単一ピークとなり、これに伴い骨髓のPh陽性細胞は消失した。骨髓ではDLI後、12週目にBV13.2に既にピークが出現していた(データ示さず)。BV24にDLI後12週目から新たなピークが出現しているが、BV13.2の

単一ピークがよりモノクローナルなT細胞の増殖を起こしていると推定されるため、本例ではBV13.2⁺T細胞がGVL効果に関連したT細胞と考えられた(図3)。症例4ではDLI後4週目にBV24に新たなピークが出現し、これに伴い骨髓のPh陽性細胞は消失した(図4)。骨髓では末梢血同様、4週目にBV24ピーク

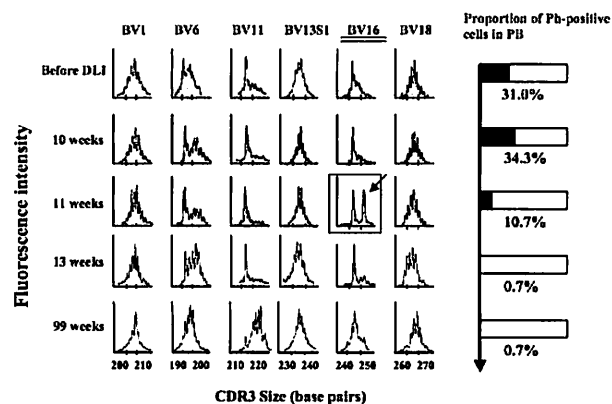


Fig. 1. Changes in CDR3 size distributions and percentage of Ph⁺ cells in peripheral blood after DLI in patient 1. BV16⁺ T cells showed clonal proliferation as indicated by an arrow in association with decrease of Ph⁺ cells.

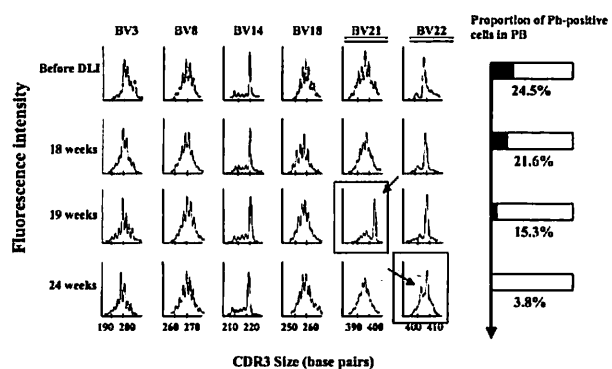


Fig. 2. Changes in CDR3 size distributions and percentage of Ph⁺ cells in peripheral blood after DLI in patient 2. BV21⁺ T cells and BV22⁺ T cells showed clonal proliferation as indicated by arrows in association with decrease of Ph⁺ cells.

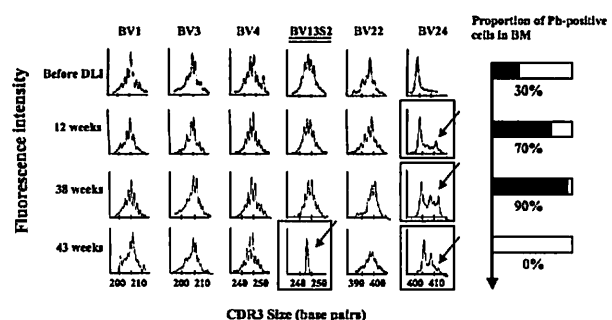


Fig. 3. Changes in CDR3 size distributions in peripheral blood and percentage of Ph⁺ cells in bone marrow after DLI in patient 3. BV24⁺ T cells and BV13s2⁺ T cells showed clonal proliferation as shown by arrows in association with decrease of Ph⁺ cells.

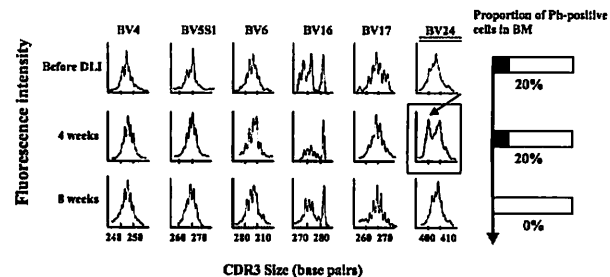


Fig. 4. Changes in CDR3 size distributions in peripheral blood and percentage of Ph⁺ cells in bone marrow after DLI in patient 4. BV24⁺ T cells showed clonal proliferation as indicated by an arrow in association with decrease of Ph⁺ cells.

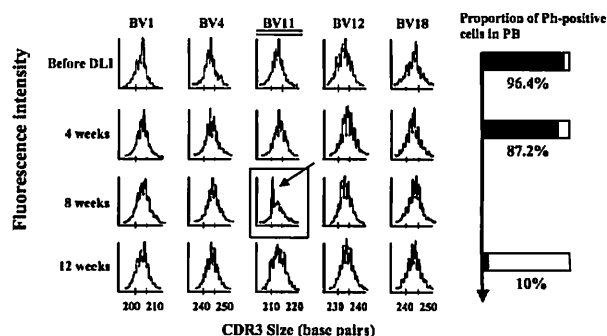


Fig. 5. Changes in CDR3 size distributions and percentage of Ph⁺ cells in peripheral blood after DLI in patient 5. BV11⁺ T cells showed clonal proliferation as shown by an arrow in association with decrease of Ph⁺ cells.

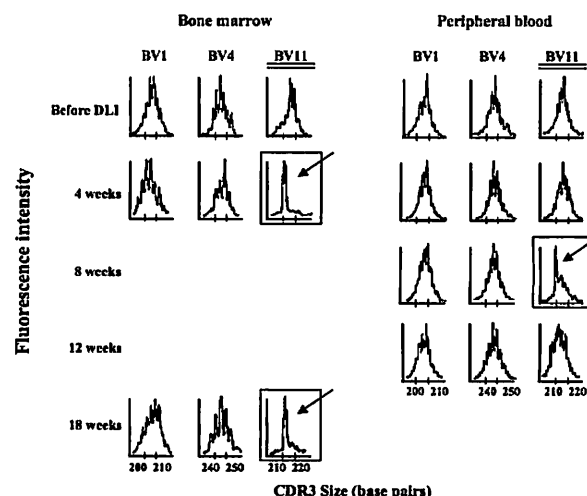


Fig. 6. Changes in CDR3 size distributions in bone marrow and peripheral blood after DLI in patient 5. BV11⁺ T cells showed clonal proliferation as indicated by an arrow

Table 2. BV family showing clonal proliferation and the time when the clonal T-cell proliferation appeared after DLI

Patient	BV family	PB peak (Week)	BM peak (Week)	Change in the Percentage of Ph ⁺ cells(%)
1	BV16	11	5	31.0* → 0.7*
2	BV21	19	19	24.5* → 3.8*
3	BV13.2	43	12	90.0* → 0.0*
4	BV24	4	4	20.0* → 0.0*
5	BV11	8	4	96.4* → 10.0*

Percentage of Ph⁺ cells before and after DLI are shown. *, percentage of Ph⁺ cells determined by FISH analysis of peripheral blood granulocytes; **, percentage of Ph⁺ cells in the bone marrow mitotic cells determined by G-banding of chromosomes. BV, beta chain variable region gene; PB, peripheral blood; BM, bone marrow.

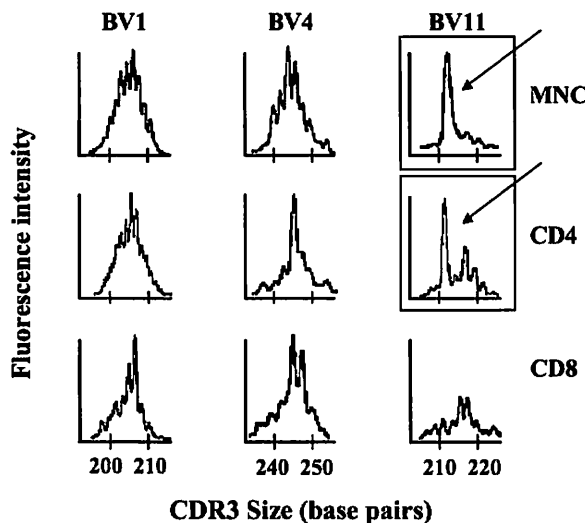


Fig. 7. Changes in CDR3 size distributions of peripheral blood mononuclear cells (MNC), CD4⁺ and CD8⁺ T cells 8 weeks after DLI in patient 5. CDR3 size distributions of 3 representative BV families are shown. Fluorescence intensity (y-axis) is being plotted against CDR3 size (x-axis). Clonal T cells were identified as BV11⁺ CD4⁺ as indicated by an arrow.

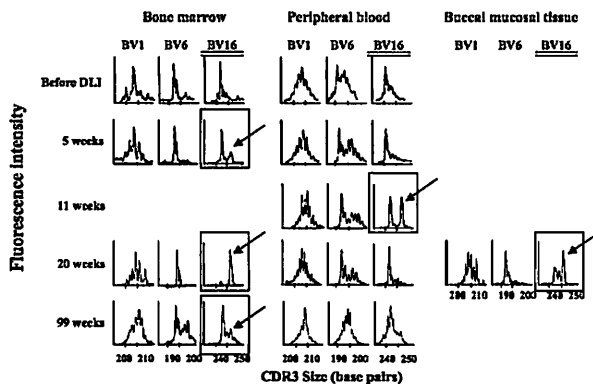


Fig. 8. Changes in CDR3 size distributions in bone marrow, peripheral blood and buccal mucosal tissue affected by chronic GVHD in patient 1. The same clonal peak of BV16⁺ T cells was detected in these different tissues as indicated by arrows.

が出現した(データ示さず)。症例5ではDLI後8週目にBV11に新たなピークが出現し、これに伴い末梢血のPh陽性細胞は減少した(図5)。骨髄ではDLI後4週目からBV11が単一ピークとなり、18週目でもピークが残存した(図6)。以上の5例のすべてにおいて、DLI後の4週～43週後に特定のBVファミリーに抗原特異的なT細胞の一過性増殖がみられ、これに伴ってPh陽性細胞の割合が減少した。これらBVファミリーの抗原特異的なT細胞は、GVL効果の発現に伴い一過性に増殖したことからGVL効果に関連したT細胞と考えられた。CDR3サイズ分布に偏倚やピークを認めたBVファミリーの種類は各例で異なっていた。末梢血と骨髄のピークの出現時期を比較したところ5例中3例で、骨髄の方が末梢血よりも早期にピークが出現していた(表2)。症例5の末梢血単核球でのCDR3のサイズ分布解析においてDLI後8週目にピークを示した検体をCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞に分離し、それぞれの細胞について単核球と同様にCDR3のサイズ分布解析を行ったところ、CD4⁺T細胞のみ単一ピークを示した(図7)。他の4例についても解析を行ったところ同様の結果が得られ(データ示さず)、これよりこの抗原特異的なT細胞はCD4陽性細胞であることが分かった。

II. GVL効果担当T細胞の定量

症例1の骨髄、末梢血、頬粘膜について経時的にT細胞のCDR3サイズ分布解析を行った。慢性GVHDでは頬粘膜にT細胞が浸潤するため、浸潤したT細胞はGVL効果に関連したT細胞と推定できる。このため、DLI後に慢性GVHDを発症した症例1については頬粘膜組織も評価した。慢性GVHDが発症した際、その発現に一致してBV16に単一ピークが出現した(図8)。このため、この症例についてはBV16陽性細胞がGVL効果を担っていると考えられた。末梢血、骨髄および頬粘膜組織BV16の単一ピーク部からDNAを抽出し、前述の方法でクローニングをおこないCDR3領域のシーケンスを決定したところ、全ての組織に共通してQDRというアミノ酸配列が高頻度に出現していた。これらの結果より症例1においてはQDRというアミノ酸モチーフを持つT細胞がクローン性に増殖している事が判明した(表3)。

III. QDR⁺T細胞の定量

症例1におけるGVL効果担当T細胞の動態を明らかにするため、QDRのCDR3モチーフを持つBV16 cDNAを経時的に定量

Table 3. Junctional amino acid sequences of TCR BV16

V	N-D-N	J	BJ	Frequency
BV16 ⁺ T cells in peripheral blood on day 75				
CASS	LNAGGG	TGELFFGEGSRTVV	2S2	11/20
CASS	QDRSY	EQYFGPGTRLTVT	2S7	9/20
BV16 T cells in bone marrow on day 33				
CASS	QDRSY	EQYFGPGTRLTVT	2S7	1/3
CASS	VGQAVE	TQYFGPGTRLTVT	2S7	2/3
BV16 ⁺ T cells infiltrating the buccal mucosa on day 138				
CASS	QDMRGVYYN	EQYFGPGTRLTVT	2S7	5/6
CASS	QDIAAIGYN	EQYFGPGTRLTVT	2S7	1/6

BV16⁺ cDNA derived from peripheral blood, bone marrow and a buccal mucosa biopsy specimen was subjected to PCR and subcloning followed by sequencing.

した。QDRプラスミド5ng/ μ lから希釈系列を作成し、forward primer 5'-ATGAGTCCGGTATGCCCA-3'とreverse primer: 5'-TGCTCGTAGGACCTGTCTTG-3'を用いてcDNAを増幅したのち、融解曲線解析にて特異性を確認した。このリアルタイムPCRを用いてDLIの1週前、5、10、11、13、20週目の末梢血と、DLIの1週前、5、10、20週目の骨髓血についてQDRモチーフを持つcDNAを定量した。末梢血液QDR/GAPDH値はDLI 1週前、DLI後5、10、11、13、20週目のそれぞれで順に2.13、1.87、42.73、8.92、13.22、1.62と10週目にピークを認めたのち減少した。一方、骨髓血のQDR/GAPDH値はDLI 1週前、DLI後5、10、20週目のそれぞれで順に8.21、11.34、27.82、20.08とやはり10週目にピークを示し、その後も高値を維持した(図9)。DLI前のドナー末梢血のQDR/GAPDH値は0.01未満であった。

IV. BV16⁺QDR⁺T細胞の由来

症例1についてQDRを持つBV16⁺T細胞がDLIによって持ち込まれたものか、あるいはDLI後に患者の体内で出現したものかを明らかにするため、QDRに相補的なオリゴヌクレオチドプローブを用いたサザンブロット法により微小cDNAを検出した。DLI 1週前、DLI 1週後、3週後の患者末梢血単核球cDNAおよびドナー末梢血単核球cDNAからBV16 cDNAを増幅し、

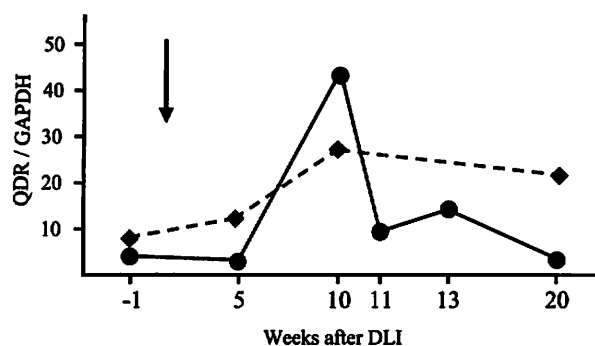


Fig. 9. Change in the QDR/GAPDH ratios in peripheral blood and bone marrow after DLI in patient 1. \rightarrow , DLI; \bullet , peripheral blood; \blacklozenge , bone marrow.

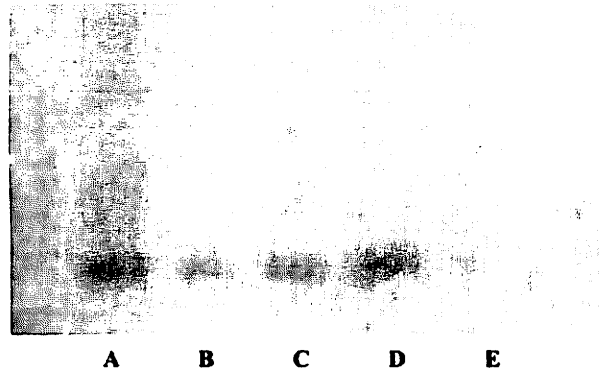


Fig. 10. Southern blotting analysis using specific primers for BV16⁺T cells with a CDR3 sequence of QDR in patient 1. (A), positive control (plasmid of QDR); (B), patient peripheral blood before DLI; (C), 1 week after DLI; (D), 3 weeks after DLI; (E), donor peripheral blood.

QDRプローブを用いてハイブリダイゼーションを行ったところ、患者末梢血単核球にはDLI前の検体でもバンドが検出されたが、ドナー末梢血単核球には特異的なバンドは検出されなかった(図10)。

考 察

1979年、同種骨髓移植後に急性および慢性GVHDを合併した症例の方が非合併例に比べて再発率が低く、生存率が高いことがシアトルグループから報告され、ヒトにおけるGVL効果が確認された¹⁴⁾。このGVL効果によって造血幹細胞移植は広く普及し、白血病などに対する標準的治療法として確立されてきた。CMLに対するDLIの明らかなGVL効果は、同種造血幹細胞移植の治療効果が抗白血病免疫あるいは抗原特異的免疫反応に依存していることを示している。

造血幹細胞移植療法(stem cell transplantation, SCT)はPhクロンの撲滅によってCMLを根治させる現時点での唯一の治療方法である。50歳以下の慢性期CMLの患者では同胞からのSCTにより、70%以上の長期生存が得られる。近年、Ph染色体の遺伝子産物bcr/ablを標的とした分子標的治療薬で、チロシンキナーゼ阻害剤のメシル酸イマチニブの効果が実証され、CMLの治療は大きく変化しつつあるが、長期的な寛解維持あるいは最終的に治癒にいたるかどうかはいまだ不明である¹⁵⁾。同種造血幹細胞移植再発に対してメシル酸イマチニブを投与した群とDLIを行った群を比較したWeisserら¹⁶⁾の報告では、メシル酸イマチニブ投与群の方で有意に再発率が高く、生存率が低かった。この報告からもGVL効果が長期的な寛解を得るために必要であることは間違いなく、抗腫瘍効果におけるアロ免疫の重要性が示唆される。

CML慢性期再発に対するDLI施行後や造血幹細胞移植後には、一部のT細胞ファミリーに抗原特異的な増殖がみられることから、これらのクローン性に増殖したT細胞がGVHDやGVL効果に関与している事が推測されている¹⁷⁾。しかし、このようなGVL効果を担当していると考えられるT細胞を定量し、経時的推移をみたという報告はない。今回の検討の結果、症例1の末梢血ではBV16⁺T細胞のクローン性増殖に先立ってQDR⁺T細胞クローン量は最高値となり、その後BV16⁺T細胞の減少に伴って徐々に低下した。骨髓におけるQDR⁺GVL効果担当T細胞は末梢血よりも早く増加し、DLI後20週目でも残存していた。これまでの報告では、DLI後GVL効果が発現するまでには2-3ヶ月が必要であるとされている¹⁸⁾¹⁹⁾。検討した5例中3例の骨髓では約1ヶ月でT細胞レパトアに変化がみられたことから、骨髓では末梢血よりも早期に抗原特異的なT細胞の増殖が起こっている事が示唆された。また、骨髓では末梢血中で減少した後もこのクローン量の高値が維持されていたことから、このT細胞は寛解の維持に関与している可能性が示唆された。末梢血中で検出されるT細胞のクローン性増殖は、骨髓中の同じ抗原特異的T細胞の増殖が最高点に達した際に一過性に末梢血に流出したものであり、標的であるPh陽性造血幹細胞の減少に伴って、T細胞の増殖が鎮静化した結果、末梢血から消失したと考えられる。今回、GVL効果担当T細胞を経時的に定量したのは1例のみであったが、骨髓T細胞レパトアの変化が長期に渡り残存する症例では長期的な寛解を維持しており、同様の現象が起こっているものと推測される。

GVL効果担当T細胞の由来を明らかにするため、ドナーT細胞

胞由来のcDNAを検索した結果、サザンブロット法およびリアルタイムPCR法のどちらの方法でもQDRのモチーフを持つGVL効果担当T細胞は検出できなかった。しかし、患者の末梢血中にはDLI前にすでにこのT細胞が流血中に存在する事が確認された。流血中にわずかに存在した細胞がDLIによって活性化された結果、クローン性増殖が誘導されたと推測される。

これまでのCML慢性期再発に対するDLIを行った報告では、DLI後70%以上の例で永続的な寛解が得られている^{20)~22)}。今回検証した5例では全ての症例が細胞遺伝学的寛解となり、うち4例は5年を超えて長期寛解を維持している。移植の前処置を弱めて移植関連毒性を少なくし、GVL効果に期待した緩和的前処置による造血幹細胞移植 (reduced-intensity stem cell transplantation, RIST) の症例も集積されている。最近のOrら²³⁾による報告ではリン酸フルダラビンとメルファランで前処置を行ったCML患者24例についての5年全生存率、無病生存率は85%と極めて良い成績であった。

GVL効果の標的抗原として、HLA (Human leukocyte antigen) 抗原やマイナー組織適合性抗原 (minor histocompatibility antigen, mHA) などのアロ抗原、腫瘍関連抗原 (tumor-associated antigen, TAA)、腫瘍特異抗原 (tumor-specific antigen, TSA) などがあげられる。臨床的にはGVL効果の発現はGVHDの発症と密接に関連することから、多くの場合アロ抗原が標的分子となっていると考えられている。最近のマウスモデルを用いた研究によって、GVL効果の発現にはドナー由来抗原提示細胞 (antigen-presenting cell, APC) と腫瘍が同一のアロ抗原を提示している必要があることが示され、GVL標的抗原としてのアロ抗原の重要性が示された²⁴⁾。また、GVLがmHAによるものかTAA/TSAによるものか検討したShlomchikら²⁵⁾のマウスモデルを用いた報告では、GVLはmHAによって誘導されることが結論づけられている。

一般にmHA抗原を認識するT細胞はHLA class Iによって提示される抗原に特異的なCD8⁺T細胞と考えられている。しかし、最近の報告²⁶⁾ではHLA class IIが提示するmHAの存在も示されている。またマウスモデルを用いた検討により、CMLに対するGVL効果担当T細胞はCD4⁺T細胞であることが示されている²⁵⁾。今回の我々の検討では、DLI後に増殖した抗原特異的T細胞はCD4⁺T細胞であった。テキサス大学のMichalekら²⁷⁾はHLA-DR不適合同種造血幹細胞移植において、不適合DR抗原に特異的なCD4⁺T細胞がGVHD発症期に著増したことを報告した。今回検索した患者とドナーの間にはHLA不適合はなかったことから、このCD4⁺T細胞はmHAを標的としたGVL効果担当T細胞と推定される。HLA class IIは血液細胞が選択的に発現していることからclass IIによって提示されるmHAに特異的なCD4⁺T細胞は強いGVHDをおこさず強力なGVL効果を発揮すると考えられている。したがって、本研究で同定したCD4⁺GVL効果担当T細胞の標的抗原が同定されれば、毒性の少ないアロ免疫療法に应用できる可能性がある。

結 論

GVL効果に関与するT細胞の動態を明らかにするため、DLIが有効であった移植後再発CML 5例について、T細胞レセプターβ鎖V領域 CDR3サイズ分布解析を用いて末梢血・骨髄のT細胞レパトアを経時的に解析した。さらに1例についてはGVL効果を担当していると考えられるT細胞をリアルタイムPCR

を用いて定量し、以下の結果を得た。

1. 検討した5例全てにおいて、特定のBVファミリーに抗原特異的なT細胞の一過性増殖がみられ、これに伴ってPh陽性細胞が減少した。この増殖したT細胞クローンを持つBVファミリーは5例全てで異なっていた。このGVL効果担当T細胞のクローン性増殖は、5例中3例で末梢血より骨髄で早期に検出された。
2. 症例1のこのクローンはQDRというCDR3のアミノ酸モチーフを持っていた。リアルタイムPCRを用いてこのQDR⁺BV16⁺T細胞のDLI後の推移を検討したところ、骨髄のQDR⁺T細胞クローンは末梢血より早く増加し、DLI後も長期にわたり残存した。したがってこのクローンが長期寛解の維持に関与している事が示唆された。
3. リアルタイムPCRおよびサザンブロット法では、ドナー由来のT細胞中にQDR⁺T細胞は検出されなかった。一方、患者の末梢血中にはDLI前よりこのQDR配列が検出されたことから、GVL効果担当T細胞はDLI前に既にマイナー組織適合抗原によって感作されていたT細胞であると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始ご指導とご校閲を賜りました金沢大学大学院医学系研究科細胞移植学講座 中尾眞二教授、直接実験をご指導賜りました近藤恭夫助教に深甚なる謝意を表します。さらに本研究の遂行にご協力賜りました金沢大学附属病院輸血部の諸先生方に厚く御礼申し上げます。また、貴重な検体を提供してくださいました長野赤十字病院、慶応大学病院の諸先生方にこころより深く感謝いたします。

文 献

- 1) Kolb HJ, Mittermüller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, Heim M, Wilmanns W. Donor leukocyte transfusions for treatment of chronic recurrent myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* 76: 2462-2465, 1990
- 2) Huff CA, Fuchs EJ, Smith BD, Blackford A, Garrett-Mayer E, Brodsky RA, Flinn IW, Ambinder RF, Borrello IM, Matsui WH, Vogelsang GB, Griffin CA, Luznik L, Jones RJ. Graft-versus-host reactions and the effectiveness of donor lymphocyte infusions. *Biol Blood Marrow Transplant* 12: 414-421, 2006
- 3) Kolb HJ, EBMT Immunology and Chronic Leukemia Working Parties. Donor leukocyte transfusions for treatment of leukemic relapse after bone marrow transplantation. *Vox Sang* 74: 321-329, 1998
- 4) Mackinnon S, Papadopoulos EB, Carabasi MH, Reich L, Collins NH, Boulad F, Castro-Malaspina H, Childs BH, Gillio AP, Kernan NA. Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation: separation of graft-versus-leukemia responses from graft-versus-host disease. *Blood* 86: 1261-1268, 1995
- 5) Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 75: 555-562, 1990
- 6) Dickinson AM, Wang XN, Sviland L, Vyth-Dreese FA, Jackson GH, Schumacher TN, Haanen JB, Mutis T, Goulmy E. In situ dissection of the graft-versus-host activities of cytotoxic T

cells specific for minor histocompatibility antigens. *Nat Med.* 8: 410-414, 2002

7) Kondo Y, Shiobara S, Nakao S. Identification of T-cell clones showing expansion associated with graft-vs-leukemia effect on chronic myelogenous leukemia in vivo and in vitro. *Exp Hematol* 29: 471-476, 2001

8) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987

9) Choi YW, Kotzin B, Herron L, Callahan J, Marrack P, Kappler J. Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin "superantigens" with human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 8941-8945, 1989

10) Labrecque N, McGrath H, Subramanyam M, Huber BT, Sekaly RP. Human T cells respond to mouse mammary tumor virus-encoded superantigen: V beta restriction and conserved evolutionary features. *J Exp Med* 177: 1735-1743, 1993

11) Pannetier C, Cochet M, Darche S, Casrouge A, Zoller M, Kourilsky P. The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 4319-4323, 1993

12) Pannetier C, Even J, Kourilsky P. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol Today* 16: 176-181, 1995

13) Currier JR, Deulofeut H, Barron KS, Kehn PJ, Robinson MA. Mitogens, superantigens, and nominal antigens elicit distinctive patterns of TCRB CDR3 diversity. *Hum Immunol* 48: 39-51, 1996

14) Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, Storb R. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med* 300: 1068-1073, 1979

15) Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F, Hochhaus A, Powell BL, Gabrilove JL, Rousselot P, Reiffers J, Cornelissen JJ, Hughes T, Agis H, Fischer T, Verhoef G, Shepherd J, Saglio G, Gratwohl A, Nielsen JL, Radich JP, Simonsson B, Taylor K, Baccarani M, So C, Letvak L, Larson RA; IRIS Investigators. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 355 : 2408-2417, 2006

16) Weisser M, Tischer J, Schnittger S, Schoch C, Ledderose G, Kolb HJ. A comparison of donor lymphocyte infusions or imatinib mesylate for patients with chronic myelogenous leukemia who have relapsed after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 91: 663-666, 2006

17) Liu QF, Li YQ, Yang D, Zhang Y, Yang LJ, Chen SH, Sun J, Liu XL, Zhou SY. Changes in the T-cell receptor V beta gene repertoire after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Chin Med J (Engl)* 117: 413-418, 2004

18) Dazzi F, Szydlo RM, Craddock C, Cross NC, Kaeda J,

Chase A, Olavarria E, van Rhee F, Kanfer E, Apperley JF, Goldman JM. Comparison of single-dose and escalating-dose regimens of donor lymphocyte infusion for relapse after allografting for chronic myeloid leukemia. *Blood* 95: 67-71, 2000

19) Drobyski WR, Keever CA, Roth MS, Koethe S, Hanson G, McFadden P, Gottschall JL, Ash RC, van Tuinen P, Horowitz MM. Salvage immunotherapy using donor leukocyte infusions as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: efficacy and toxicity of a defined T-cell dose. *Blood* 82: 2310-2318, 1993

20) Collins RH Jr, Shpilberg O, Drobyski WR, Porter DL, Giral S, Champlin R, Goodman SA, Wolff SN, Hu W, Verfaillie C, List A, Dalton W, Ognoskie N, Chetrit A, Antin JH, Nemunaitis J. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 15: 433-444, 1997

21) Huff CA, Fuchs EJ, Smith BD, Blackford A, Garrett-Mayer E, Brodsky RA, Flinn IW, Ambinder RF, Borrello IM, Matsui WH, Vogelsang GB, Griffin CA, Luznik L, Jones RJ. Graft-versus-host reactions and the effectiveness of donor lymphocyte infusions. *Biol Blood Marrow Transplant* 12: 414-421, 2006

22) Shiobara S, Nakao S, Ueda M, Yamazaki H, Takahashi S, Asano S, Yabe H, Kato S, Imoto S, Maruta A, Yoshida T, Gondo H, Morishima Y, Kodaera Y. Donor leukocyte infusion for Japanese patients with relapsed leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: lower incidence of acute graft-versus-host disease and improved outcome. *Bone Marrow Transplant* 26: 769-774, 2000

23) Or R, Shapira MY, Resnick I, Amar A, Ackerstein A, Samuel S, Aker M, Naparstek E, Nagler A, Slavin S. Nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation for the treatment of chronic myeloid leukemia in first chronic phase. *Blood* 101: 441-445, 2003

24) Reddy P, Maeda Y, Liu C, Krijanovski OI, Korngold R, Ferrara JL. A crucial role for antigen-presenting cells and alloantigen expression in graft-versus-leukemia responses. *Nat Med* 11: 1244-1249, 2005

25) Shlomchik WD, Matte-Martone CC. Leukemia-specific antigens alone are insufficient for GVL in MHC-matched allogeneic stem cell transplantation: an essential role for minor H antigens. (abstr) *Blood* 108: 59a, 2006

26) Spaapen RM, Lokhorst HM, van den Oudenalder K, Otterud BE, Dolstra H, Leppert MF, Minnema MC, Bloem AC, Mutis T. Toward targeting B cell cancers with CD4⁺ CTLs: identification of a CD19-encoded minor histocompatibility antigen using a novel genome-wide analysis. *J Exp Med* 205: 2863-2872, 2008

27) Michálek J, Collins RH, Hill BJ, Brenchley JM, Douek DC. Identification and monitoring of graft-versus-host specific T-cell clone in stem cell transplantation. *Lancet* 361(9364): 1183-1185, 2003

Kinetics of T cells mediating graft-versus-leukemia effect in patients following donor lymphocyte infusion

Takeharu Kotani, Department of Cellular Transplantation Biology, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 Jusen Med. Soc., 117, 122 – 129 (2008)

Key words BV repertoire, CML, DLI, GVL effect, real-time PCR

Abstract

Donor lymphocyte infusion (DLI) is effective for patients with chronic myelogenous leukemia (CML) in chronic phase who relapse after allogeneic stem cell transplantation. In CML patients responding to DLI, CD4 positive T cells with a particular clonotype proliferate in peripheral blood (PB) a few months after DLI associated with a decrease in the percentage of Philadelphia chromosome (Ph) positive cells. In order to clarify the kinetics of T cells mediating graft-versus-leukemia (GVL) effect, we serially studied a T cell receptor (TCR) repertoire in PB and bone marrow (BM) of 5 patients with CML responding to DLI, using TCR β -chain V region CDR3 size distribution analysis. A transient clonal T cell expansion with limited BV families were observed in all patients and the BV families with a biased CDR3 size distribution varied from one patient to another. Clonal proliferation of T cells with a certain BV family in BM preceded that in PB in 3 of the five patients. To further analyze kinetics of such putative GVL-mediating T cells after DLI, CDR3 sequence of cDNA derived from a BV16⁺ T cell showing such clonal proliferation in one patient (Patient 1) was determined. The T cell clone proved to have a CDR3 motif of QDR, and when the cDNA of QDR⁺ T cells derived from PB and BM of Patient 1 was serially quantified using a primer that was specific to this CDR3 sequence with real-time PCR, the QDR/GAPDH ratio in PB reached a peak 10 weeks after DLI and rapidly decreased thereafter. In contrast, the QDR/GAPDH ratio in BM increased 5 weeks after DLI, reached a peak in 10 weeks, and then remained high even after 20 weeks of DLI. Southern blot analysis using an oligomer complementary to the QDR sequence as a probe failed to show the presence of QDR⁺ T cells in donor's PB while it revealed QDR⁺ T cells in recipient's PB obtained before DLI. These findings suggest that clonal expansion of limited number of T cells in BM may reflect ongoing GVL reaction while clonal proliferation transiently detectable in PB may represent overflow the GVL-mediating T cells from BM and that GVL-mediating T cells are not derived from a DLI inoculum but are present in patient's PB prior to DLI.